

08.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 1 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 5 2 1 1 8
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 5 2 1 1 8]

出 願 人
Applicant(s): 旭化成メディカル株式会社

REC'D 02 DEC 2004

WIPO

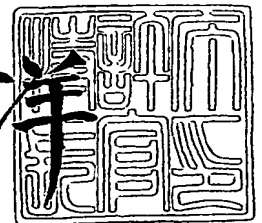
PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 4 6 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 A31661A
【提出日】 平成15年10月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式会社内
 【氏名】 寺嶋 修司
【発明者】
 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式会社内
 【氏名】 安武 幹智
【特許出願人】
 【識別番号】 000116806
 【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターに導入して必要細胞を該フィルターに捕捉し、不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収する細胞濃縮物の調製方法であって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、上記フィルターに先ず該不要細胞に富む層を導入し、続いて該必要細胞に富む層を導入して必要細胞を該フィルターに捕捉しながら該フィルター内に残存する不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収することを特徴とする、細胞濃縮物の調製方法。

【請求項 2】

不要細胞を重力または遠心力によって沈降させることによって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離する、請求項 1 記載の調製方法。

【請求項 3】

不要細胞を凝集させた後に不要細胞を重力または遠心力によって沈降させることによって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離する、請求項 1 記載の調製方法。

【請求項 4】

前記必要細胞が有核細胞で、前記不要細胞が赤血球である、請求項 1 乃至 3 の何れかに記載の調製方法。

【請求項 5】

前記有核細胞が造血幹細胞である、請求項 4 記載の調製方法。

【請求項 6】

少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液にヒドロキシエチルスターチを添加することによって、不要細胞を凝集させる、請求項 3 記載の調製方法。

【請求項 7】

前記必要細胞に富む層が必要細胞濃厚層と必要細胞希薄層からなり、フィルターに必要細胞濃厚層、必要細胞希薄層の順で導入する、請求項 1 乃至 6 の何れかに記載の調製方法。

【請求項 8】

前記必要細胞希薄層の一部または全部を回収液の少なくとも一部として用いる、請求項 7 記載の調製方法。

【請求項 9】

前記フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収した後に、更に回収した必要細胞含有液を遠心分離し、上清を除くことにより必要細胞を濃縮する、請求項 1 乃至 8 の何れかに記載の調製方法。

【請求項 10】

少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターに先ず該不要細胞に富む層を導入し、続いて該必要細胞に富む層を導入して必要細胞を該フィルターに捕捉しながら該フィルター内に残存する不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収することによって得られる、必要細胞が濃縮された細胞組成物。

【請求項 11】

前記細胞組成物を更に遠心分離し、上清を除くことにより必要細胞を濃縮して得られる、請求項 10 記載の細胞組成物。

【請求項 12】

前記必要細胞が有核細胞で、前記不要細胞が赤血球である請求項 10 または 11 記載の細胞組成物。

【請求項 1 3】

前記有核細胞が造血幹細胞である請求項 1 2 記載の細胞組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞濃縮物の調製方法および細胞組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞含有液中の有核細胞などの必要細胞を分離、濃縮して凍結保存用の細胞浮遊液を作成するための細胞濃縮物の調製方法および細胞組成物に関する。更に詳しくは、本発明は、凍結保存用細胞浮遊液中の有核細胞などの必要細胞の濃度を高め、凍結保存用細胞浮遊液の容積を少なくするための細胞濃縮物の調製方法および細胞組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、白血病などの造血器腫瘍及び固形癌の化学療法における副作用である造血障害に対して、末梢血、骨髓、臍帯血の中の造血幹細胞を移植することが盛んに行われるようになった。そのほとんどの場合、細胞は移植前まで凍結保存されるが、凍結保存には莫大な費用がかかるため、通常凍結前に赤血球や血漿など移植に不要な成分を除去して保存容積を削減する処理が施される。例えば、臍帯血は胎盤と臍の緒から平均で100ml程度採取できるが、多くの臍帯血バンクでは、臍帯血から赤血球、血漿などを除去して20mlに減容した後、凍害保護剤を5ml加えて25mlで凍結保存している。しかしながら、これらの臍帯血はドナーと患者のヒト白血球抗原（HLA）が一致するまで長期間凍結保存されることが多く、保存費用削減のために、更に減容するニーズが高まっている。

【0003】

従来、血液から治療に必要な成分を分離する方法として、比重遠心法、赤血球凝集法、バフィーコート法、抗体を用いたアフィニティ分離法などが行われてきた。しかしながら、比重遠心法は赤血球、血漿の除去率が高く、減容効果は大きいものの、比重液（例えばファルマシア社製 Ficoll）に原料となる細胞浮遊液を重層させる際に液面を乱してはならないなど、非常に熟練を要する煩雑な操作である上、開放系で操作されるため雑菌混入のリスクが大きく、また目的細胞の回収率が低いなどの問題がある。非特許文献1および非特許文献2では、ヒドロキシエチルスターチ等と混和して、赤血球の連鎖形成により赤血球を凝集、沈降させ、上層の白血球層を分離する赤血球凝集法が提案されているが、白血球の回収率を高めようとする多くの赤血球が混入して減容の妨げとなり、逆に赤血球の混入を抑えようすると白血球の回収率が低下するといったように、赤血球除去と白血球回収の両者を同時に十分満たすことができないといった問題がある。非特許文献3では、血液が貯留されたバッグを強遠心して上層の血漿層、中間層の主に白血球と血小板からなるバフィーコート層、下層の赤血球層を形成させ、上層の血漿層と下層の赤血球層をバッグから追い出して中間層のバフィーコート層を回収するバフィーコート法が提案されているが、やはり赤血球凝集法と同じ問題がある。抗体を用いたアフィニティ分離法では、特異性は高く減容効果は大きいものの、分離した細胞を回収するためには、結合した抗体分子を酵素処理するため、細胞の損傷、コスト高、操作の煩雑さなどの問題がある。

【0004】

簡便で細胞の分離効率の比較的高い細胞分離法として、特許文献1、特許文献2および特許文献3においてフィルターを用いる方法が開示されている。特に特許文献4では、血液を濾過後、フィルターにリンス液を導入してフィルター内に残存する赤血球を洗い流した後、フィルターに回収液を導入してフィルター内に捕捉された目的細胞を回収するため、赤血球除去率、目的細胞回収率ともに高い。しかしながら、目的細胞の生存率や機能を高く維持するためにリンス液にアルブミンなどの蛋白を添加する必要があり、またリンス液を通液する際にフィルターに血液回路中のエアが入り込んで濾過不能（エアブロック）になったり、フィルターにエアが入らないように濾過前にリンス液でフィルターをプライミングしておく必要があるなど、非常に煩雑な操作を余儀なくされる。

【0005】

以上のように、細胞浮遊液から目的細胞を分離、濃縮する既存の技術には、改良すべき

多くの課題が残されている。簡便な操作で、必要細胞と不要細胞を効率的に分離して凍結保存容積を削減する方法の確立が望まれている。

【0006】

特許文献5では、「細胞含有液としては、末梢血、骨髓、臍帯血、リンパ液及びこれらに遠心分離等何らかの処理を施したもの」との記載があるが、濾過する前の細胞含有液の処理によって必要細胞と不要細胞の分離効率を高められるとの記載は一切ない。

【0007】

また、フィルターを用いて細胞の分離効率を高める方法として、特許文献6にフィルターで血液を濾過する前に血液の貯留部において血球濃度勾配を形成した後、貯留部下層の血液から白血球除去フィルターで濾過する方法が開示されている。特許文献6で開示された技術は、濾過初期におけるフィルター材料はアルブミン等の血球粘着を抑制する血漿蛋白で十分に覆われておらず、除去したい白血球が多く粘着し、一方比重の軽い血小板は不均質化した全血製剤の上層に多く存在し、血小板がフィルター材料と接触する時にはフィルター材料表面がアルブミン等の血漿蛋白で覆われ血小板粘着が抑制され多くの血小板が回収されることにより、白血球と血小板の分離効率を高める技術である。特許文献6には、本発明のように、先に不要細胞に富む層を濾過してフィルター内に一部の必要細胞を捕捉し、不要細胞を流出させ、その時点でフィルター内に残留する不要細胞を、その後必要細胞に富む層で洗い流しながらフィルター内に必要細胞を捕捉し、その後回収液をフィルターに導入して必要細胞を回収する、という技術思想は全くない。

【0008】

【非特許文献1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp 10119-10122 (1995)

【非特許文献2】Indian J. Med. Res., Vol. 106, pp 16-19 (1997)

【非特許文献3】Bone Marrow Transplantation, Vol. 23, pp 505-509 (1999)

【特許文献1】特開平10-201470号公報

【特許文献2】特開平10-137557号公報

【特許文献3】特開平11-206875号公報

【特許文献4】特開平11-56351号公報

【特許文献5】国際公開第98/32840号パンフレット

【特許文献6】国際公開第02/087660号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液をフィルターで濾過した後、フィルターに回収液を導入してフィルターに捕捉されている必要細胞を回収する際、簡便な操作で細胞含有液から必要細胞と不要細胞を効率的に分離することにより、必要細胞を含む凍結保存用溶液の容積を少なくできる、細胞濃縮物の調製方法および細胞組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液をフィルターで濾過して必要細胞をフィルターに捕捉し、不要細胞はフィルターから排出させた後、回収液をフィルターに導入してフィルターに捕捉されている必要細胞を回収する方法において、細胞含有液をフィルターで濾過する前に必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、不要細胞に富む層、必要細胞に富む層をこの順に濾過することにより、必要細胞をフィルターに捕捉しながらフィルター内に残存する不要細胞をフィルターから排出できるため、必要細胞の高回収と不要細胞の高除去を同時に達成でき、簡便な操作で細胞含有液を極めて小さな容積にできることを見出し、本発

明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) 少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターに導入して必要細胞を該フィルターに捕捉し、不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収する細胞濃縮物の調製方法であって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、上記フィルターに先ず該不要細胞に富む層を導入し、続いて該必要細胞に富む層を導入して必要細胞を該フィルターに捕捉しながら該フィルター内に残存する不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収することを特徴とする、細胞濃縮物の調製方法。

【0012】

(2) 不要細胞を重力または遠心力によって沈降させることによって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離する、(1)記載の調製方法。

(3) 不要細胞を凝集させた後に不要細胞を重力または遠心力によって沈降させることによって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離する、(1)記載の調製方法。

【0013】

(4) 前記必要細胞が有核細胞で、前記不要細胞が赤血球である、(1)乃至(3)の何れかに記載の調製方法。

(5) 前記有核細胞が造血幹細胞である、(4)記載の調製方法。

(6) 少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液にヒドロキシエチルスターチを添加することによって、不要細胞を凝集させる、(3)記載の調製方法。

【0014】

(7) 前記必要細胞に富む層が必要細胞濃厚層と必要細胞希薄層からなり、フィルターに必要細胞濃厚層、必要細胞希薄層の順で導入する、(1)乃至(6)の何れかに記載の調製方法。

(8) 前記必要細胞希薄層の一部または全部を回収液の少なくとも一部として用いる、(7)記載の調製方法。

(9) 前記フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収した後に、更に回収した必要細胞含有液を遠心分離し、上清を除くことにより必要細胞を濃縮する、(1)乃至(8)の何れかに記載の調製方法。

【0015】

(10) 少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターに先ず該不要細胞に富む層を導入し、続いて該必要細胞に富む層を導入して必要細胞を該フィルターに捕捉しながら該フィルター内に残存する不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収することによって得られる、必要細胞が濃縮された細胞組成物。

【0016】

(11) 前記細胞組成物を更に遠心分離し、上清を除くことにより必要細胞を濃縮して得られる、(10)記載の細胞組成物。

(12) 前記必要細胞が有核細胞で、前記不要細胞が赤血球である(10)または(11)記載の細胞組成物。

(13) 前記有核細胞が造血幹細胞である(12)記載の細胞組成物。

【発明の効果】

【0017】

本発明の細胞濃縮物の調製方法によれば、簡便な操作で細胞浮遊液から必要細胞と不要

細胞を効率的に分離できるため、凍結保存容積を大幅に削減できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明で言う必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液とは、骨髓、末梢血、G-CSFなどの造血因子投与による動員末梢血、臍帯血、あるいはこれらを生理食塩水、細胞培養用培地、緩衝液、抗凝固剤などで希釈したものなどが挙げられる。

【0019】

必要細胞の例としては、有核細胞、白血球、単核球、リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、造血幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、有核赤血球など、細胞治療、診断等に有用で分離回収を必要とする細胞が挙げられる。

【0020】

一方、不要細胞の例としては、赤血球、血小板、顆粒球など、必要細胞と混在していると凍結解凍時の破壊細胞によるレシピエントへの副作用や必要細胞の低回収等の悪影響を持つ細胞が挙げられる。

【0021】

本発明における必要細胞と不要細胞の組み合わせの例としては、必要細胞が単核球で、不要細胞が赤血球のケースが挙げられる。この場合、単核球はフィルターに捕捉され、一方で赤血球は通過する。その後、回収液にてフィルターに捕捉された単核球が回収される。

【0022】

本発明で言う「必要細胞に富む層」とは、層分離する前の細胞含有液中の必要細胞の50%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、特に好ましくは80%以上が含まれる層のことを言う。必要細胞の割合が50%を下回った場合、濾過の前半に必要細胞がフィルターに捕捉され、その後は捕捉された必要細胞を洗い続けることになり、必要細胞の回収率の低下を招くため好ましくない。

【0023】

また、本発明で言う「不要細胞に富む層」とは、層分離する前の細胞含有液中の不要細胞の60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上が含まれる層のことを言う。不要細胞の割合が60%を下回った場合、後から濾過される必要細胞に富む層に不要細胞が多く混入して、フィルター内に不要細胞が多く残存することになるため、フィルターに捕捉された必要細胞を回収した際、多くの不要細胞が混入してくるので、必要細胞浮遊液の体積を減らすことが難しくなる。

【0024】

本発明による細胞濃縮物の調製方法を例示すると、図1に示したシステムを用いる方法が挙げられる。11、12、13は血液導管、21、22、23はクランプ、31、32はT字管、4は細胞分離フィルター、5は細胞分離フィルター4に捕捉された必要細胞を回収する回収バッグ、6は回収液注入口、7は細胞分離フィルターから排出された不要細胞を貯留するドレインバッグである。まず、細胞含有液を貯留した血液バッグを血液導管11と接続し、細胞含有液を遠心などの方法により必要細胞と不要細胞に層分離する。次にクランプ21と23を開け、細胞分離フィルター4に先ず不要細胞に富む層を導入し、続いて必要細胞に富む層を導入する。本発明によって必要細胞と不要細胞が効率的に分離できるのは、不要細胞に富む層、必要細胞に富む層をこの順に濾過することにより、必要細胞を細胞分離フィルター4に捕捉しながら細胞分離フィルター4内部に残存する不要細胞をフィルターから排出できるためである。例えば、細胞含有液を層分離した後に必要細胞に富む層だけを取り出して細胞分離フィルター4で濾過した場合、移し変えによる細胞ロス、界面の乱れによる不要細胞の混入の問題があり必要細胞の高回収と不要細胞の高除去を同時に達成できない。また、層分離せずに細胞分離フィルター4で濾過した場合、細胞分離フィルター4内部に不要細胞が多く残留し、不要細胞の除去率を十分高められない。即ち、細胞の分離効率を高めるためには、細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離し、先ず不要細胞に富む層から、続いて必要細胞に富む層を細胞分離フイ

ルター 4 に導入することが非常に重要なのである。必要細胞に富む層と不要細胞に富む層を細胞分離フィルター 4 に導入する方法は特に限定はないが、落差、ポンプ、あるいはバッグを押しつぶして導入する方法が挙げられる。この際、血液バッグは、不要細胞に富む層では出口に向かって傾斜していると先に導入する不要細胞が残留しにくいため好ましい。濾過された細胞含有液はドレインバッグ 7 に貯留する。血液バッグ内の全ての細胞含有液が細胞分離フィルター 4 に導入された後、クランプ 21、23 を閉じる。次に、クランプ 22 を開けて回収液注入口 6 から回収液を細胞分離フィルター 4 に導入し、回収バッグ 5 に必要細胞を回収する。

【0025】

本発明で行う「少なくとも必要細胞と不要細胞を含む細胞浮遊液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離する」方法としては、細胞含有液の貯留部で両層を形成できる方法であればいかなる方法でもよいが、重力または遠心力による方法が比較的簡便で好ましい。また、細胞含有液の貯留部の形状としては、血液バッグ、遠心管などが挙げられるが、フィルターへの導入の容易さから血液バッグが好ましい。

【0026】

また、この層分離の前に不要細胞を凝集させると層分離の時間短縮だけでなく、必要細胞と不要細胞の分離効率を更に高められるためより好ましい。但し、凝集したものがフィルターを通過しないと細胞の分離効率が大きく低下するだけでなく、フィルターの目詰まりを誘発する恐れもあるため、フィルターの濾材の孔径より小さいか、あるいは濾材の小孔をすり抜けられる性質のものであることが好ましい。不要細胞が赤血球の場合、ヒドロキシエチルスターチ、デキストランなどで赤血球を凝集させる方法を用いることができる。陰性荷電の赤血球表面にこれら高分子溶液が付着すると血球間の反発力が減弱して赤血球は重なり合い、銭を連ねた状態（連銭形成と呼ばれる）になり、沈降を促進する。しかしながら、赤血球同士の結合は弱く、物理的衝撃により容易に凝集は分解するため、本発明のように凝集、沈降させた後に濾過する場合に好ましい。

【0027】

本発明で言う必要細胞濃厚層および必要細胞希薄層とは、必要細胞に富む層に含まれる必要細胞の 70% 以上、好ましくは 80% 以上が必要細胞濃厚層に、残りが必要細胞希薄層に含まれていることをいう。例えば、血液中の白血球を必要細胞、赤血球を不要細胞とした場合、血液を 3000 G 以上の強い遠心力で遠心すると、上層の血漿層（必要細胞希薄層）、中間層の白血球に富むバフィーコート層（必要細胞濃厚層）、下層の赤血球層（不要細胞に富む層）の三層に分離される。この場合、上層（必要細胞希薄層）の血漿の一部または全部を回収液の少なくとも一部として用いることができる。また、必要細胞が高濃度でフィルター内に導入、捕捉されるため、回収が容易となるため好ましい。

【0028】

本発明で言うフィルターとは、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターを言う。本発明で言う「必要細胞を実質的に捕捉」とは、細胞含有液中の必要細胞の 60% 以上（より好ましくは 70% 以上）をフィルター内に捕捉することを言う。また、本発明で言う「不要細胞は実質的に通過」とは、細胞含有液中の不要細胞の 60% 以上（より好ましくは 70% 以上）がフィルターを通過することを言う。

【0029】

本発明に用いるフィルターの濾材として用いる多孔質体は、水不溶性であればいかなる材質でも使用可能であるが、成形性、滅菌性に優れ、細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等の合成高分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン等の金属があげられる。

【0030】

濾材の形状としては、粒状、繊維塊、織布、不織布、平板、スポンジ状構造体等があげ

られるが、体積あたりの表面積が大きいという点で不織布、スポンジ状構造体が好ましい。

【0031】

フィルターの濾材が不織布の場合、平均繊維径は $1.0\mu\text{m}$ 以上 $30\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは $1.0\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下であり、さらにより好ましくは $1.5\mu\text{m}$ 以上 $10\mu\text{m}$ 以下である。 $1.0\mu\text{m}$ 未満では必要細胞が強固に捕捉されてしまい回収困難となる可能性があるだけでなく、不要細胞の通過、特に凝集させた場合の通過を困難にする。また、 $30\mu\text{m}$ を超えると必要細胞が繊維に捕捉されず素通りする可能性が高くなる。いずれの場合も回収率の低下につながるおそれがあるので好ましくない。

【0032】

また、スポンジ状構造体を用いる場合、平均孔径は通常 $2.0\mu\text{m}$ 以上 $25\mu\text{m}$ 以下であり、好ましくは $3.0\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下であり、さらにより好ましくは $4.0\mu\text{m}$ 以上 $15\mu\text{m}$ 以下である。 $2.0\mu\text{m}$ 未満では流れ性が劣り、不要細胞の通過、特に凝集させた場合の通過を困難にするだけでなく、通液自体が困難になるおそれがある。また $25\mu\text{m}$ を超えると必要細胞の捕捉率が低下し、回収率の低下を招くので好ましくない。

【0033】

本発明における平均繊維径とは、以下の手順に従って求められる値をいう。即ち多孔質構造体を構成する、実質的に均一と認められるフィルター要素の一部をサンプリングし、走査型電子顕微鏡などを用いて、1000~3000倍の倍率で写真に撮る。サンプリングに際しては、フィルター要素の有効濾過断面積部分を、一辺が $0.5\sim 1\text{cm}$ の正方形によって区分し、その中から3ヶ所以上、好ましくは5ヶ所以上をランダムサンプリングする。ランダムサンプリングするには、例えば上記各区分に番地を指定した後、乱数表を使うなどの方法で、必要箇所以上の区分を選べばよい。またサンプリングした各区分について、3ヶ所以上、好ましくは5ヶ所以上を写真に撮る。このようにして得た写真について、写っている全ての繊維の直径を測定する。ここで直径とは、繊維軸に対して直角方向の繊維の幅をいう。測定した全ての繊維の直径の和を、繊維の数で割った値を平均繊維径とする。但し、複数の繊維が重なり合っており、他の繊維の陰になってその幅が測定できない場合、また複数の繊維が溶融するなどして、太い繊維になっている場合、更に著しく直径の異なる繊維が混在している場合、等々の場合には、これらのデータは削除する。以上の方法により、500本以上、好ましくは1000本以上のデータにより平均繊維径を求める。

【0034】

本発明における平均孔径とは、多孔質構造体表面から捕捉材の厚み方向に対して 0.5mm 以下の部分で血液の流れ方向に対しできるだけ垂直に切断したある厚みを持った検体を水銀圧入法（島津製作所、ポアサイザ9320）で測定し、水銀が多孔質構造体の細孔に全く入っていない状態を水銀圧入量0%、多孔質素子のすべての細孔に入っている状態を水銀圧入量100%とした時、水銀圧入量50%に当たる点が本発明でいう平均孔径である。尚、水銀ポロシメーターでの測定は $1\sim 1000\text{psia}$ の圧力範囲で測定する。非常に柔軟なためそのままでは水銀ポロシメーターで測定する際に変形を受け、細孔が検出できないような多孔質構造体であっても、細孔が圧変形されないように固定化する等の予備調整を施すことにより上記測定が可能となる多孔質構造体も本発明に含まれる。

【0035】

また、これらの濾材はこのままでも用いられるが、必要に応じ、アミノ酸、ペプチド、糖タンパク（抗体、接着分子等のバイオリガンドを含む）といった、特定の細胞に親和性のあるリガンドを固定してもよい。さらに、フィルターに血小板通過性を付与する場合、例えば特公平6-51060号公報で提案されているように、ヒドロキシエチルメタクリレートを主成分とする合成高分子等で濾材表面を改質してもよい。

【0036】

また、フィルターの容器としては特に限定はないが、例えば、特公平2-13588号公報に示される白血球除去フィルター形状のような容器を用いることができる。また、これらにおいて細胞含有液の入口と出口以外に回収液の入口と出口を別に設けてもよい。

【0037】

容器の材質としては、水不溶性で、成形性、滅菌性に優れ、細胞毒性が低いものが好ましい。さらに、濾過時に細胞含有液をフィルターに導入する場合や、回収時に回収液をフィルターに導入する場合に、フィルター内部に負荷される圧力によって実質的に膨張しない硬い材質が好ましい。濾過時にフィルターの容器が膨張すると回収液の流速が低下して濾材に捕捉された有核細胞を洗い流す剪断力が低下するため、また多くの回収液が残留して回収率が低下するため好ましくない。また、容器の溶着部の破損のおそれもある。好ましい材質としては、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等が挙げられるが、硬質かつ医療用途に適したものであればこれらに限定されない。

【0038】

本発明で用いる回収液としては、必要細胞の損傷が少なく、且つ高率に回収可能なものが好ましい。好ましいものを例示すると、市販の生理食塩液、PBS（リン酸緩衝液）やHBSS（ハンクス液）等の緩衝液、RPMI 1640等の細胞培養用培地、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子溶液、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルスターチ、デキストラン、キチン誘導体、コラーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子溶液、グルコース、サッカロース、マルトース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド等の有機物溶液及びこれらの混合物が挙げられる。また、2価カチオンを除去して細胞剥離を容易にする目的でキレート剤が含有されていてもよい。デキストランやヒドロキシエチルスターチ等の高分子溶液は凍害保護剤としても機能するため、そのまま或いはDMSO等の凍害保護剤を更に添加することで凍結保存も可能である上、生食等に比し粘性を上げることができ、回収時の剪断力を向上できるため、我々の評価では好結果を得ており、回収液としてより好ましい。また、前述したように細胞含有液を層分離する際得られる必要細胞希薄層の一部または全部は、回収液の少なくとも一部として用いることができる。この場合、自己由来成分であるため必要細胞へのダメージがなく、またウイルス感染のリスクもないため好ましい。

【0039】

本発明で行う回収方法としては、特に限定しないが、回収液の流速は剪断力を高め、必要細胞を高率で回収するためにできるだけ高速が好ましいが、内圧上昇によるフィルターとチューブ等の接続部のはずれや、必要細胞へのダメージを起こさない流速に制御することが好ましい。また、回収液をフィルターに導入する手段は、シリンジポンプ、ブラッドポンプ、ペリスタポンプ等の装置を用いるものや、簡便法としてシリンジを手で押す方法、液体を貯留したバッグを押しつぶして液流を惹起する方法、落差処理等が挙げられる。更に、必要細胞の回収率をより高めるために、フィルターに振動を加えとか、ストップドフロー等を行ってもよい。回収液をフィルターに導入する方向は、細胞含有液を導入した方向と同方向または逆方向があるが、一般的に後者の方が細胞回収率が高いので好ましい。

【0040】

また、フィルターに回収液を導入して必要細胞を回収後に、更に回収した必要細胞含有液を遠心して上清を除くことにより、更に必要細胞を濃縮でき、好ましい。

【0041】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例及び比較例は臍帯血から単核球を分離、濃縮し、最終容積を4 cm³にする方法について例示する。この場合の必要細胞は単核球で、不要細胞は赤血球である。

【実施例】

【0042】

実施例1：赤血球凝集剤で臍帯血を層分離したものを濾過する方法

(1) 細胞分離フィルターの作製

上容器と下容器からなり、組み立てた後の内寸が縦43 mm、横43 mm、高さ2.9

mm (有効濾過断面積 18.5 cm^2 、内容積 7 cm^3)で液体流出口と液体流入口を最長対角線上にもつポリカーボネート製容器の入口側から、第1層目に平均繊維径 $12\text{ }\mu\text{m}$ のポリエステル不織布 0.14 g を、第2層目に $1.7\text{ }\mu\text{m}$ のポリエステル不織布 1.28 g を、第3層目に平均繊維径 $1.1\text{ }\mu\text{m}$ のポリエステル不織布 0.19 g を充填した。尚、第1層目、第2層目および第3層目の充填密度はそれぞれ 0.20 g/cm^3 、 0.24 g/cm^3 および 0.20 g/cm^3 であった。また、該細胞分離フィルターに血小板通過性を付与する目的で、親水性ポリマーのコーティングを行った。即ち、ヒドロキシエチルメタクリレート・ジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体(モル比で97:3)の1%エタノール溶液を該細胞分離フィルターの液体流入口から通液し、窒素ガスで余分なポリマー溶液をバージした後、 60°C で8時間以上真空乾燥機で乾燥させた。

【0043】

(2) 細胞分離システム

図1の細胞分離システムを使用した。

【0044】

(3) 細胞濃縮操作

事前にクランプ21、22、23を閉じておいた。 200 cm^3 血液バッグに貯留されたCPD加ヒト臍帯血 100 cm^3 (ヘマトクリット値27.8%)に、6%ヒドロキシエチルスターチ(菱山製薬「HES40(赤血球沈降剤)」)を 20 cm^3 添加して、10分間混和した。次に、血液バッグと血液導管11を接続し、血液バッグを吊り下げ、1時間静置した。血液バッグ内の赤血球が沈降し、上層の白血球層と下層の赤血球層の界面が明確になったことを確認後、クランプ21と23を開け、落差により濾過を開始した。この時、下層の赤血球層から細胞分離フィルター4に流れ、続いて上層の白血球層が流れていき、細胞分離フィルター4内に残留する赤血球が洗い流される様子が観察された。濾過された血液はドレインバッグ7に貯留した。血液バッグ内の全ての血液が細胞分離フィルター4に導入されたことを確認後、クランプ21、23を閉じた。次に、10%デキストラン生理食塩水溶液(小林製薬「デキストラン40注」)にヒト血清アルブミンを最終濃度3%になるように添加した液体 19 cm^3 とエア 18 cm^3 をシリンジに充填した。次に、クランプ22を開けて回収液注入口6から、液体、気体の順に手動で通液し、回収バッグ5に単核球を回収した(回収単核球液1)。この場合の回収された細胞液量は 23 cm^3 、ヘマトクリット値は3.5%、回収に要した時間は2秒(流速 $570\text{ cm}^3/\text{分}$)であった。更にこの後、回収された単核球をコニカルチューブに移し、 $400\text{ G}\times 15\text{ 分}$ の遠心条件で遠心分離した。最終容積が 4 cm^3 になるように上清を除去した後、転倒混和して沈さをほぐした(回収単核球液2)。

【0045】

(4) 分析

本細胞濃縮操作での細胞数のカウントは多項目自動血球分析装置(シスメックス社SF3000)を用いて測定し、回収単核球液1の赤血球容積、単核球回収率1、単核球回収率2を以下の計算式にて算出した。

赤血球容積(cm^3) = 回収単核球液1のヘマトクリット値 \times 回収単核球液1の液量 $\div 100$

単核球回収率1(%) = $100 \times (\text{回収単核球液1の単核球数} / \text{臍帯血の単核球数})$

単核球回収率2(%) = $100 \times (\text{回収単核球液2の単核球数} / \text{臍帯血の単核球数})$

【0046】

(5) 結果

本細胞濃縮操作での赤血球容積は 0.8 cm^3 、単核球回収率1は85%、単核球回収率2は82%であった。

【0047】

実施例2: 強遠心で臍帯血を層分離したものを濾過する方法

(1) 細胞分離フィルターの作製

実施例1と同じものを使用した。

【0048】

(2) 細胞分離システム

図1の細胞分離システムを使用した。

【0049】

(3) 細胞分離操作

事前に図1の細胞分離システムのクランプ21、22、23を閉じておいた。CPD加ヒト臍帯血100 cm³ (ヘマトクリット値31.1%)を貯留した200 cm³血液バッグと血液導管11を接続し、血液バッグが垂直に立った状態で遠心カップに固定し、3000 Gで12分間、10℃で遠心した。次に遠心カップから血液バッグと細胞分離システムを静かに取り出し、血液バッグを吊り下げた。この時血液バッグ内は、上層の血漿層、中間層の Buffy コート層、下層の赤血球層の三層に層分離していた。界面を乱さないように上層の血漿層から回収液用にシリンジに19 cm³採取し、クランプ21と23を開け、落差により濾過した。この時、下層の赤血球層から細胞分離フィルター4に流れ、続いて中間層の Buffy コート層、最後に上層の血漿層が流れていき、細胞分離フィルター4内に残留する赤血球が洗い流される様子が観察された。濾過された血液はドレインバッグ7に貯留した。血液バッグ内の全ての血液が細胞分離フィルター4に導入されたことを確認後、クランプ21、23を閉じた。その後、先にシリンジに採取しておいた血漿にエア18 cm³を加え、クランプ22を開けた後、回収液注入口6から液体、気体の順に手動で通液し、回収バッグ5に単核球を回収した(回収単核球液1)。この場合の回収された細胞液量は23 cm³、ヘマトクリット値0.12%、回収に要した時間は2秒(流速570 cm³/分)であった。更にこの後、回収された単核球をコニカルチューブに移し、400 G×15分の遠心条件で遠心分離した。最終容積が4 cm³になるように上清を除去した後、転倒混和して沈さを解した(回収単核球液2)。

【0050】

(4) 結果

本細胞濃縮操作での赤血球容積は0.5 cm³、単核球回収率1は87%、単核球回収率2は84%であった。

【0051】

比較例1：臍帯血を層分離せずに濾過する方法

(1) 細胞分離フィルターの作製

実施例1と同じものを使用した。

【0052】

(2) 細胞分離システム

図1の細胞分離システムを使用した。

【0053】

(3) 細胞分離操作

100 cm³の臍帯血(ヘマトクリット値28.2%)を層分離せずにそのまま細胞分離フィルター4に導入し、それ以降は実施例1と同様の操作を行った。回収された細胞液量は23 cm³で、ヘマトクリット値は9.1%、回収に要した時間は2秒(流速570 cm³/分)であった。

【0054】

(4) 結果

本細胞濃縮操作での赤血球容積は2.1 cm³、単核球回収率1は85%、単核球回収率2は60%であった。

【0055】

比較例2：臍帯血を赤血球凝集法で単核球分離する方法1

200 cm³血液バッグに貯留されたCPD加ヒト臍帯血100 cm³(ヘマトクリット値29.6%)に、6%ヒドロキシエチルスターチ(菱山製薬「HES40(赤血球沈降剤)」)を20 cm³添加して、10分間混和した。この血液バッグを垂直に立つように遠心カップに固定して、50 G×5分、10℃で遠心した。次に、分離スタンドで血液バ

ックを押さえてできるだけ赤血球層を吸い上げないように上層の白血球層 60 cm^3 を採取し（単核球回収液1）、コニカルチューブに移し変えた。単核球回収率1のヘマトクリット値は2.5%であった。更に、 $400\text{ G}\times 10$ 分、 10°C で遠心後、沈さ 4 ml を残して上清を除去し、転倒混和して沈さを解した（単核球回収液2）。本細胞濃縮操作での赤血球容積は 1.5 cm^3 、単核球回収率1は66%、単核球回収率2は58%であった。

【0056】

比較例3：臍帯血を赤血球凝集法で単核球分離する方法2

200 cm^3 血液バッグに貯留されたCPD加ヒト臍帯血 100 cm^3 （ヘマトクリット値33.3%）に、6%ヒドロキシエチルスターチ（菱山製薬「HES40（赤血球沈降剤）」）を 20 cm^3 添加して、10分間混和した。この血液バッグを垂直に立つように遠心カップに固定して、 $50\text{ G}\times 5$ 分、 10°C で遠心した。次に、分離スタンドで血液バッグを押さえて下層の赤血球層を含め上層の白血球層 65 cm^3 を採取し（単核球回収液1）、コニカルチューブに移し変えた。単核球回収率1のヘマトクリット値は10%であった。更に、 $400\text{ G}\times 10$ 分、 10°C で遠心後、沈さ 4 ml を残して上清を除去した（単核球回収液2）。本細胞濃縮操作での赤血球容積は 6.5 cm^3 、単核球回収率1は85%、単核球回収率2は32%であった。

【0057】

比較例4：強遠心で臍帯血を層分離して単核球分離する方法

上部と下部にそれぞれ抜き取り用の導管を有する 200 cm^3 血液バッグにCPD加ヒト臍帯血 100 cm^3 （ヘマトクリット値27.3%）を貯留し、垂直に立つように遠心カップに固定して、 $3000\text{ G}\times 12$ 分、 10°C で遠心した。分離スタンドで血液バッグを押さえつけ、血液バッグの上から上層の血漿層を、血液バッグの下から下層の赤血球層を追いつけ、血液バッグ内にバフィーコート層を含め 30 cm^3 残るようにした（単核球回収液1）。単核球回収液1のヘマトクリット値は40%であった。次にコニカルチューブに移し変え、 $400\text{ G}\times 10$ 分、 10°C で遠心後、沈さ 4 ml を残して上清を除去した（単核球回収液2）。本細胞濃縮操作での赤血球容積は 12.0 cm^3 、単核球回収率1は95%、単核球回収率2は21%であった。

【0058】

実施例及び比較例の結果を表1にまとめた。表1の結果から分かるように、本発明の実施例の方法によれば、赤血球容量を削減できると同時に、高い単核球回収率を達成することができる。

【0059】

【表1】

	赤血球容量	単核球回収率1	単核球回収率2
実施例1	0.8 cm^3	85%	82%
実施例2	0.5 cm^3	87%	84%
比較例1	2.1 cm^3	85%	60%
比較例2	1.5 cm^3	66%	58%
比較例3	6.5 cm^3	85%	32%
比較例4	12.0 cm^3	95%	21%

【産業上の利用可能性】

【0060】

本発明による細胞濃縮物の調製方法は、細胞の凍結保存の前処理手段として用いられ、簡便に骨髓、臍帯血、末梢血等の細胞含有液から単核球等の必要細胞を赤血球等の不要細胞から効率的に分離でき、必要細胞の凍結保存溶液の容積を大幅に小さく出来るので必要

細胞の凍結保存に有用な方法であり、保存コストを低く抑えるのに有効な手段として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

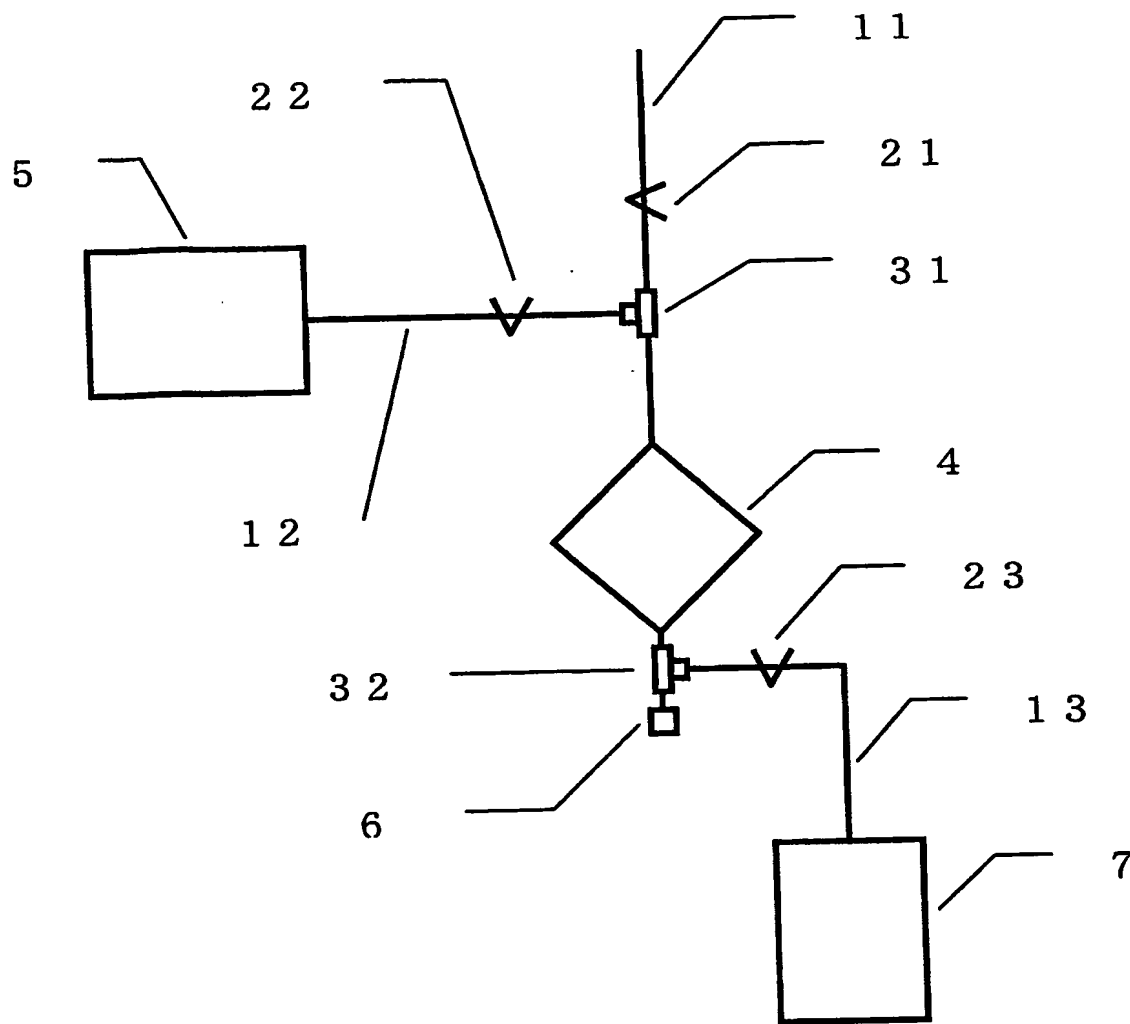
【図1】図1は、本発明による細胞濃縮物の調製方法を行うためのシステムの一例を示す。

【符号の説明】

【0062】

- 11 血液導管
- 12 血液導管
- 13 血液導管
- 21 クランプ
- 22 クランプ
- 23 クランプ
- 31 T字管
- 32 T字管
- 4 細胞分離フィルター
- 5 回収バッグ
- 6 回収液注入口
- 7 ドレインバッグ

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液をフィルターで濾過した後、フィルターに回収液を導入してフィルターに捕捉されている必要細胞を回収する際、簡便な操作で細胞含有液から必要細胞と不要細胞を効率的に分離することにより、必要細胞を含む凍結保存用溶液の容積を少なくできる、細胞濃縮物の調製方法および細胞組成物を提供すること。

【解決手段】 少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を、必要細胞を実質的に捕捉し、不要細胞は実質的に通過するフィルターに導入して必要細胞を該フィルターに捕捉し、不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収する細胞濃縮物の調製方法であって、少なくとも必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液を必要細胞に富む層と不要細胞に富む層に層分離した後、上記フィルターに先ず該不要細胞に富む層を導入し、続いて該必要細胞に富む層を導入して必要細胞を該フィルターに捕捉しながら該フィルター内に残存する不要細胞を排出させた後、該フィルターに回収液を導入して該フィルターに捕捉されている必要細胞を回収することを特徴とする、細胞濃縮物の調製方法。

【選択図】 なし

特願 2003-352118

出願人履歴情報

識別番号

[000116806]

1. 変更年月日

1998年 6月11日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都千代田区神田美土代町9番地1

氏名

旭メディカル株式会社

2. 変更年月日

2004年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住所

東京都千代田区神田美土代町9番地1

氏名

旭化成メディカル株式会社